

# ADAMTS7 在缺血性心肌病患者心肌组织中的表达变化

徐瑶 刘剑芳 王梦龙 叶晶 姜慧敏 王震 万军

**【摘要】 目的:**探讨含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 (ADAMTS)7 在缺血性心肌病(ICM)患者心肌组织中的表达情况及意义。 **方法:**收集 ICM 终末期行器官移植患者(ICM 组,  $n=11$ )及配型未成功的正常人(对照组,  $n=6$ )的心室肌组织标本。利用天狼星红染色法测定 ICM 组及对照组心肌间质胶原沉积程度,实时荧光定量 PCR 法检测两组心肌组织中 ADAMTS7 mRNA 表达水平,Western blot 法检测两组心肌组织中 ADAMTS7 蛋白表达水平。 **结果:**与对照组相比,ICM 组心肌间质中胶原沉积明显加重,心肌胶原容积百分比 $[(23.15 \pm 2.43)\% \text{ 对 } (2.03 \pm 0.60)\%, P < 0.05]$ 、ADAMTS7 mRNA 表达水平 $(1.42 \pm 0.11 \text{ 对 } 1.01 \pm 0.08, P < 0.05)$ 、ADAMTS7 蛋白表达水平 $(2.32 \pm 0.09 \text{ 对 } 1.04 \pm 0.05, P < 0.05)$ 均明显升高。 **结论:** ICM 患者心肌组织纤维化程度增强,ADAMTS7 表达水平升高,ADAMTS7 可能通过影响心肌纤维化进程参与 ICM 的发生发展。

**【关键词】** 缺血性心肌病;含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 7;细胞外基质;心肌纤维化

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.05.016

缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy, ICM)是由于冠状动脉粥样硬化病变使心肌缺血、缺氧而引起心肌细胞减少、心肌坏死、心肌纤维化、心肌瘢痕形成的疾病,最终导致心力衰竭。ICM 已经成为我国心力衰竭的首要病因<sup>[1]</sup>。研究 ICM 发生发展的病理生理机制及可能的治疗靶点具有重要意义。

研究发现,含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(ADAMTS)家族属于依赖  $Zn^{2+}$  的分泌型金属蛋白酶类,具有降解细胞外基质的作用。ADAMTS 家族包括 19 个成员,根据作用底物的不同可分为 5 组:(1)蛋白聚糖酶,包括 ADAMTS1、4、5、8、9、15、20;(2)骨肽胶原酶,包括 ADAMTS2、3、14;(3)软骨基质蛋白(cartilage oligomeric matrix protein, COMP)裂解酶,包括 ADAMTS7、12;(4)血管性血友病因子蛋白降解酶,包括 ADAMTS13;(5)孤立酶,包

括 ADMATS6、10、16、17、18、19<sup>[2]</sup>。研究表明,ADAMTS 家族在心血管疾病、骨关节炎、肿瘤、炎症中均发挥调节作用,参与多种疾病的发生发展<sup>[3-5]</sup>。其中,ADAMTS7 被发现与动脉粥样硬化、急性心肌梗死及缺血/再灌注损伤等密切相关<sup>[6-9]</sup>,但是有关 ADAMTS7 在 ICM 患者心肌组织中表达的研究甚少。本文拟通过检测 ICM 患者心肌组织中 ADAMTS7 的表达情况,分析 ADAMTS7 与心肌纤维化的关系,探讨 ADAMTS7 在 ICM 发病中的作用机制。

## 1 对象与方法

### 1.1 人体标本收集

本实验经武汉大学人民医院医学伦理委员会批准,所有受试对象或其授权委托人均签署知情同意书。所取心肌组织来自 ICM 终末期行器官移植患者(ICM 组,  $n=11$ )和配型未成功的正常人(对照组,  $n=6$ )。所有 ICM 组患者均符合 WHO 关于 ICM 的诊断标准及分型标准,除外合并糖尿病及严重肝肾疾病患者。两组标本均来自男性,获得离体

心脏后在最快时间内完成冲洗分装,于液氮中速冻,-80℃冰箱中保存备用。

1.2 天狼星红染色法评估心肌组织纤维化程度

取分装后的左室较大块组织以 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋。将包埋好的石蜡切片置于二甲苯溶液中浸泡并于梯度酒精中脱水 3 次,冲洗干净后用 0.2%磷钼酸浸泡,0.1%天狼猩红苦味酸充分染色 90 min。经过 70%、95%乙醇各 30 s,100%乙醇 30 s 重复 3 次,二甲苯 2 min 重复 3 次后,封片。染色后使用光学显微镜拍照并分析胶原容积百分比。

1.3 实时荧光定量 PCR 法检测 ADAMTS7 的 mRNA 表达水平

使用 Trizol 裂解液提取左室心肌组织总 RNA,将总 RNA 反转录为 cDNA。设计引物序列如下:ADAMTS7 上游引物 5'-TTCGAGATTGACTCCG GTGC-3',下游引物 5'-ATGGTCCAGCCACCAT TGAG-3'; GAPDH 上游引物 5'-GAGTCAACG GATTTGGTCTCG-3',下游引物 5'-TTGATTTTG GAGGGATCTCG-3'。在罗氏 LightCycler 480 Real-Time PCR 仪中进行 PCR 扩增,扩增条件为:95℃预变性 10 min,95℃变性 10 s,60℃退火 10 s,72℃延伸 20 s,共计 40 个循环。以 GAPDH 为对照,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法测定 ADAMTS7 mRNA 的相对表达水平。

1.4 Western blot 法检测 ADAMTS7 的蛋白表达水平

使用蛋白裂解液提取左室心肌组织总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,进行转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h。洗膜后,分别加入抗 ADAMTS7 抗体和抗 GAPDH 抗体,4℃孵育过夜,加入荧光二抗于室温下避光孵育 1 h。Odyssey 荧光检测仪检测目的条带,以 ADAMTS7 条带与 GAPDH 条带灰度值的比值为 ADAMTS7 蛋白的相对表达水平。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用 *t* 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床资料

ICM 组平均年龄为(52.91±8.75)岁,对照组平均年龄为(48.73±9.80)岁,两组间差异无统计

学意义。与对照组相比,ICM 组左室舒张末期内径(LVEDD)明显增加[(64.52±8.43) mm对(44.80±7.90) mm, $P<0.05$ ],左室射血分数(LVEF)明显降低[(30.00±6.89)%对(52.03±3.68)%, $P<0.05$ ]。

2.2 心肌组织纤维化程度

天狼星红染色后,心肌间质中的胶原成分被染为红色。光学显微镜下可见,对照组心肌间质胶原较少且分布均匀,而 ICM 组心肌间质中胶原纤维大量表达且分布紊乱,见图 1。ICM 组心肌胶原容积百分比明显高于对照组[(23.15±2.43)%对(2.03±0.60)%, $P<0.05$ ]。

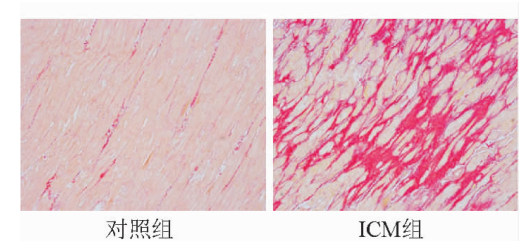


图 1 两组左室心肌组织天狼星红染色(×100)

2.3 ADAMTS7 mRNA 和蛋白表达水平

与对照组心肌组织相比,ICM 组 ADAMTS7 的 mRNA (1.42±0.11 对 1.01±0.08)和蛋白(2.32±0.09 对 1.04±0.05)表达水平均明显升高( $P$  均 $<0.05$ ),见图 2。

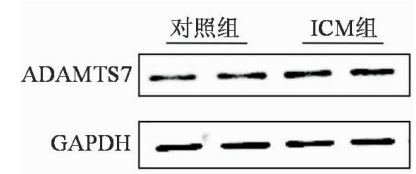


图 2 两组左室心肌组织中 ADAMTS7 蛋白的表达

3 讨论

ICM 主要由冠状动脉粥样硬化性狭窄、闭塞、痉挛及细血管网病变引起,其发生发展中伴随着心肌细胞坏死、凋亡,残存心肌细胞代偿性肥大,细胞外基质蛋白在细胞外间隙沉积,心肌成纤维细胞过度增殖、纤维化等心肌重构过程。天狼星红染色结果提示,ICM 组心肌间质胶原纤维增加,且分布紊乱,与 Valiente-Alandi 等<sup>[10]</sup>的研究结果基本一致,表明心肌重构过程中心肌纤维化程度加重,是 ICM 患者心功能严重减退的重要原因。

研究表明,ADAMTS7 通过调节 COMP、肿瘤坏死因子-α、核因子 κB (NF-κB)及白细胞介素-17

等途径参与骨关节炎及动脉粥样硬化的发生发展<sup>[11]</sup>。以白种人为研究对象的 GWAS 研究表明, ADAMTS7 基因与冠状动脉疾病密切相关<sup>[9]</sup>。此外, Wang 等<sup>[12]</sup>发现 ADAMTS7 参与介导动脉球囊损伤后动脉内膜增生及血管平滑肌细胞迁移。ADAMTS7 还可通过促进凝血酶敏感蛋白-1 降解, 抑制受损动脉的再内皮化, 促进血管重构<sup>[7]</sup>。Wu 等<sup>[8]</sup>的研究表明, 急性心肌梗死患者血浆中 ADAMTS7 水平升高, 且与脑钠肽、左室容积指数、LVEDD、左室收缩末期内径呈正相关, 提示 ADAMTS7 参与急性心肌梗死后心室重构。在急性心肌梗死大鼠模型中也发现, 心肌梗死 28 d 后, 梗死区域 ADAMTS7 表达增加, COMP 表达减少, 推测在急性心肌梗死后 ADAMTS7 通过降解 COMP 参与心肌梗死后心肌重构<sup>[6]</sup>。Bauer 等<sup>[13]</sup>报道敲除 ADAMTS7 后可以减轻 ApoE<sup>-/-</sup> 高脂血症小鼠的动脉粥样硬化程度, 提示 ADAMTS7 可能通过调节血管内皮细胞迁移及基质降解参与动脉粥样硬化病变。以上研究结果表明, ADAMTS7 可通过调节血管平滑肌及血管重构, 参与动脉粥样硬化和急性心肌梗死后病理性心肌重构。

本研究结果显示, 与对照组心肌组织相比, ICM 患者心肌间质胶原纤维沉积显著增加, 发生结构重构, ADAMTS7 的 mRNA 及蛋白表达水平也显著升高。结合其他学者的研究结果, 我们推测 ADAMTS7 可能参与了 ICM 心肌重构的病理生理过程。本研究尚存在以下不足: (1) 样本量较少, 后续研究需进一步增大样本量以验证本实验结果; (2) 仅观察到 ICM 患者心肌纤维化增强, ADAMTS7 表达增加, 尚需进一步研究以明确 ADAMTS7 在心肌纤维化中的作用及机制。

#### 参 考 文 献

- [1] 中华医学会心血管病学分会. 中国部分地区 1980、1990、2000 年慢性心力衰竭住院病例回顾性调查[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30(8):450-454.
- [2] Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, et al. The ADAMTS

(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family[J]. Genome Biol, 2015, 16:113.

- [3] 刘瑜婷, 高艳香, 郑金刚. ADAMTSs 家族与心血管疾病关系的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2016, 37(6):611-614.
- [4] Lin EA, Liu CJ. The role of ADAMTSs in arthritis[J]. Protein Cell, 2010, 1(1):33-47.
- [5] Sun Y, Huang J, Yang Z. The roles of ADAMTS in angiogenesis and cancer[J]. Tumour Biol, 2015, 36(6):4039-4051.
- [6] Wu W, Wang H, Yu C, et al. Association of ADAMTS-7 levels with cardiac function in a rat model of acute myocardial infarction[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(3):950-958.
- [7] Kessler T, Zhang L, Liu Z, et al. ADAMTS-7 inhibits re-endothelialization of injured arteries and promotes vascular remodeling through cleavage of thrombospondin-1 [J]. Circulation, 2015, 131(13):1191-1201.
- [8] Wu W, Zhou Y, Li Y, et al. Association between plasma ADAMTS-7 levels and ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction [J]. Eur J Med Res, 2015, 20:27.
- [9] Reilly MP, Li M, He J, et al. Identification of ADAMTS7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies [J]. Lancet, 2011, 377(9763):383-392.
- [10] Valiente-Alandi I, Schafer AE, Blaxall BC. Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 91:228-237.
- [11] Zhang Y, Lin J, Wei F. The function and roles of ADAMTS-7 in inflammatory diseases [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015:801546.
- [12] Wang L, Zheng J, Bai X, et al. ADAMTS-7 mediates vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in balloon-injured rat arteries[J]. Circ Res, 2009, 104(5):688-698.
- [13] Bauer RC, Tohyama J, Cui J, et al. Knockout of Adamts7, a novel coronary artery disease locus in humans, reduces atherosclerosis in mice [J]. Circulation, 2015, 131(13):1202-1213.

(收稿:2018-03-07 修回:2018-05-11)

(本文编辑:胡晓静)